

тений (Опыт ВИЛАР): научное издание / С. А. Вичканова [и др.] – М.: АДРИС, 2009. – 432 с.

7. Herde, Andreas. Untersuchungen der Cumarinmuster in Früchten ausgewählter Apiaceae. PhD Thesis, Universität Hamburg, Germany, 2005.

8. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII изд. – Т. 1–2. – Москва: ФЭМБ, 2015.

Адрес для корреспонденции:

308015, Россия,

г. Белгород, ул. Победы, д. 85,

НОЦ «Фармация»,

Белгородский государственный

национальный исследовательский университет,

тел.: +79803268487,

e-mail: boykoniknik@gmail.com,

Бойко Н. Н.

Поступила 22.09.2017 г.

Э. Э. Котова, А. Г. Котов, И. А. Колычев, С. А. Котов

РАЗРАБОТКА ТСХ - МЕТОДИК ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОНТРОЛЯ ПРИМЕСЕЙ ДЛЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ МОНОГРАФИИ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ УКРАИНЫ «ЧЕРЕДЫ ТРАВА»

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», г. Харьков, Украина

Учитывая отсутствие национальной нормативной документации на череды трехраздельной траву, актуальной является разработка новых, современных подходов к стандартизации сырья череды травы, учитывающих опыт введения монографий на лекарственное растительное сырье в Государственную фармакопею Украины (ГФУ).

Цель работы – разработка методики идентификации биологически активных веществ череды травы совместно с методикой контроля примесей других видов череды в сырье методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). При разработке использовали унифицированные методики анализа фенольных соединений методом ТСХ, которые описаны в монографиях ГФУ. Установлено, что в условиях разработанных методик испытуемые растворы, полученные из образцов череды, проявляют близкий хроматографический профиль веществ флавоноидной природы по отношению к выбранным стандартным образцам лютеолина и гиперозида, что подтверждает специфичность определения. В выбранных условиях недопустимые примеси ч. трехраздельной – ч. олиственную и ч. поникшую – возможно контролировать по их характерным зонам, которые проявляются даже в случае присутствия примесей в исследуемых образцах череды в небольших количествах (менее 5%).

Разработанные методики идентификации череды травы методом ТСХ совместно с методикой контроля примесей других видов череды предложены для введения в национальную монографию ГФУ «Череды трава».

Ключевые слова: Государственная фармакопея Украины, череда трехраздельная, череда поникшая, череда олиственная, идентификация, метод ТСХ.

ВВЕДЕНИЕ

На территории Украины широко распространены различные виды череды, а именно: ч. трехраздельная (*B. tripartita* L.), ч. поникшая (*B. cernua* L.), ч. восточная (*B. orientalis* Velen.), ч. лучевая (*B. radiata* Thuill.) и ч. олиственная (*B. frondosa* L.) [1–3].

Череды трехраздельной трава (единственная из перечисленных видов, являющаяся фармакопейным сырьем на территории Украины) описана в Государственной Фармакопее СССР (ГФ XI) [4]. Кроме того, данный вид лекарственного растительного сырья (ЛРС) описан в Государственной фармакопее Республики Беларусь (ГФ РБ) [5] и Государственной Фармакопее Рос-

сийской Федерации (ГФ 13) [6]. В ведущих фармакопеях мира данный вид сырья не описан [7].

До введения монографии на ЛРС в Государственную Фармакопею Украины качество отечественного сырья регламентируется требованиями ГФ XI, в случае череды – статьей «Трава череды». Контроль примеси ч. поникшей, которая является близким видом ч. трехраздельной и которая может быть в качестве примеси/фальсификации ЛРС, в данной статье проводится методом бумажной хроматографии. На хроматограмме исследуемого раствора не допускается присутствие темно-коричневого пятна в УФ-свете при длине волны 360 нм с R_f около 0,75 (примесь череды поникшей). Наличие зоны примеси определяется только по значению R_f без использования веществ сравнения, что не позволяет достоверно и воспроизводимо определять положение регламентированной зоны. Также недостатком этой методики является длительное время воспроизведения (более 16 часов).

В ГФ 13 идентификация сырья и контроль нефармакопейных видов череды (ч. поникшей и ч. лучистой) проводятся методом тонкослойной хроматографии (ТСХ): на хроматограмме исследуемого раствора не допускается присутствие темно-коричневых пятен в УФ-свете при длине волны 254 нм с R_f около 0,75 (примесь череды поникшей) и с R_f около 0,94 (примесь череды лучистой). Наличие зон примесей также, как и в ГФ XI, определяется только по значению R_f без использования веществ сравнения, т.е. и эта методика недостаточно специфична.

В монографии ГФ РБ также описана методика идентификации череды травы методом ТСХ, где в качестве вещества сравнения используются лютеолин-7-глюкозид, проявление хроматограммы проводят в УФ-свете при длине волны 365 нм после опрыскивания раствором 10 г/л дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира в метаноле. В данной монографии контролируется примесь ч. поникшей – не допускается дополнительного желтого пятна, расположенного в верхней трети хроматограммы выше зоны лютеолин-7-глюкозида. Необходимо отметить, что ч. олиственная в данной монографии рассматривается не как примесь череды травы, а как ЛРС (наряду с ч. трехраздельной).

Учитывая отсутствие современной национальной нормативной документации на данный вид ЛРС, а также несовершенство методик, приведенных в действующих на территории Украины нормативных документах, а именно недостаток специфичности, актуальной является разработка новых, современных подходов к стандартизации сырья череды травы, учитывающих опыт ГФУ по использованию унифицированных методик контроля качества ЛРС. В предыдущих работах нами были проведены исследования по достоверной идентификации сырья череды на стадии макроскопического анализа [8, 9], но вопрос о контроле примесей нефармакопейных видов череды и вопросы обязательного по требованиям ГФУ испытания идентификации сырья методом ТСХ остались нерешенными.

Целью работы является выбор оптимальных условий проведения анализа идентификации сырья череды травы и контроля примесей других видов череды методом ТСХ, разработка методики идентификации БАВ череды травы совместно с методикой контроля примесей в сырье методом ТСХ для введения национальных требований к качеству отечественного ЛРС в монографию ГФУ «Череды трава».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были: 7 образцов ЛРС *B. tripartita*, предоставленные различными производителями Украины; образец цельного ЛРС *B. tripartita*, собранный в Ахтырском р-не Сумской обл., Украина; образец цельного сырья *B. frondosa*, собранный в Ахтырском р-не Сумской обл., Украина; образец цельного сырья *B. cernua*, предоставленный украинским фармпроизводителем.

Испытуемый раствор. К 1,0 г измельченного в порошок сырья (500) добавляют 10 мл этанола (70%, об/об), кипятят в течение 20 мин с обратным холодильником, охлаждают и фильтруют.

Стандартные образцы. В качестве раствора сравнения был выбран раствор смеси стандартных образцов (СО) – 3 мг гиперицина, 3 мг рутина и 1 мг кофейной кислоты в 10 мл метанола (раствор сравнения 1). Также при разработке методик использовали раствор смеси стандартных образцов – 3 мг лютеолина, 3 мг лютеолин-

7-гликозида и 2 мг хлорогеновой кислоты в 10 мл метанола (раствор сравнения 2).

Неподвижная фаза. При проведении идентификации травы череды методом ТСХ в соответствии с требованиями ГФУ использовали обычные ТСХ-пластинки с толщиной слоя от 5 до 40 мкм на стеклянной и алюминиевой подложках (Silicagel 60 F₂₅₄ фирмы «Merck»).

Подвижная фаза. Использовали унифицированную подвижную фазу, которая широко применяется для анализа веществ флавоноидной природы: муравьиная кислота безводная – вода – этилацетат (10:10:80) [10].

Детектирование (визуальная оценка). Пластинку высушивали при температуре 100–105°C, еще теплую опрыскивали 1% раствором дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира в метаноле, затем 5% раствором макрогола 400 в метаноле. Пластинку сушили на воздухе в течение 30 мин и просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм (проявление А) и при дневном свете (проявление В).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 (см. обложку журнала) приведен вид хроматограмм, полученных при анализе различных серий сырья в описанных выше условиях при 2-х видах проявления.

Нанесение образца. В ходе исследований изучали влияние объема нанесения на результаты, сравнивая хроматографические профили, полученные при нанесении исследуемого раствора в количестве 5 и 10 мкл; зоны наносили с помощью микрошприца, полосами 10 x 2 мм; расстояние между полосами 1 см (рисунок 2, см. обложку журнала). Из полученных результатов был выбран наиболее подходящим объем нанесения 10 мкл.

Расстояние, которое должна пройти подвижная фаза. Сравнивали влияние расстояния, которое должна пройти подвижная фаза: 8,5–9 и 15 см. Анализ полученных хроматограмм позволяет утверждать, что для разделения хроматографических зон достаточно расстояния 8,5–9 см.

Робастность. Определяли влияние ТСХ-пластинок Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) с различными основами: стеклянной и алюминиевой. Как видно из рисунков 1–2, при использовании выбранной

подвижной фазы на всех использованных ТСХ-пластинках обнаружены близкие хроматографические профили различных исследуемых образцов череды трехраздельной относительно выбранных стандартных образцов (значение R_F, последовательность расположения зон, размер, интенсивность окраски).

После проведения валидационных исследований разработанной методики в качестве маркеров было решено использовать лютеолин и гиперозид, расположение зон которых в разработанных хроматографических условиях охватывал практически весь диапазон характерных зон на хроматограммах испытуемых растворов, полученных из череды травы.

В результате проведенных исследований различных образцов череды травы была выбрана следующая регламентация описания хроматографических зон при проведении идентификации сырья методом ТСХ:

Проявление А: на хроматограмме раствора сравнения в средней части должна проявляться желтовато-оранжевая флуоресцирующая зона (гиперозид), в верхней части – желтая флуоресцирующая зона (лютеолин). На хроматограмме испытуемого раствора ниже зоны, соответствующей гиперозиду на хроматограмме раствора сравнения, должна проявляться желтовато-коричневая флуоресцирующая зона, выше нее, в порядке возрастания R_F, должны проявляться интенсивная желто-оранжевая флуоресцирующая зона и фиолетово-коричневая флуоресцирующая зона. В верхней трети хроматограммы испытуемого раствора ниже уровня зоны, соответствующей лютеолину на хроматограмме раствора сравнения, должны проявляться, в порядке возрастания R_F, синяя флуоресцирующая и интенсивная голубая флуоресцирующая зоны. На уровне зоны лютеолина должна проявляться желтая флуоресцирующая зона, которая перекрывается красной флуоресцирующей зоной. На хроматограмме испытуемого раствора могут проявляться и другие зоны.

Проявление В: на хроматограмме раствора сравнения в средней части должна проявляться оранжевая зона (гиперозид), в верхней части – желтая зона (лютеолин). На хроматограмме испытуемого раствора ниже зоны, соответствующей гиперозиду

ду на хроматограмме раствора сравнения, должна проявляться коричнево-фиолетовая зона, выше нее, в порядке возрастания R_f , должны проявляться интенсивная желто-оранжевая зона и розово-фиолетовая зона. В верхней части хроматограммы испытуемого раствора на уровне зоны, соответствующей лютеолину на хромато-

грамме раствора сравнения, должна проявляться желтая зона. На хроматограмме испытуемого раствора могут проявляться и другие зоны.

Далее приведена регламентация хроматографического профиля в виде схемы хроматограммы для включения в методику монографии ГФУ (схема 1).

Проявление А:

Верхняя часть пластинки	
лютеолин: желтая флуоресцирующая зона	желтая флуоресцирующая зона, которая перекрывается красной флуоресцирующей зоной
	интенсивная голубая флуоресцирующая зона
	синяя флуоресцирующая зона
	фиолетово-коричневая флуоресцирующая зона
гиперозид: желтовато-коричневая флуоресцирующая зона	интенсивная желто-оранжевая флуоресцирующая зона
	желтовато-коричневая флуоресцирующая зона
Раствор сравнения	Испытуемый раствор

Проявление В:

Верхняя часть пластинки	
лютеолин: желтая зона	желтая зона
	розово-фиолетовая зона
	интенсивная желтовато-оранжевая зона
гиперозид: оранжевая зона	коричнево-фиолетовая зона
Раствор сравнения	Испытуемый раствор

Схема 1 – Схема хроматограмм раздела «Идентификация» проекта монографии ГФУ «Череды трава»

Определение недопустимых примесей череды олиственной и череды поникшей на одной хроматографической пластинке в условиях проведения методики идентификации. Для этого на одну хроматографическую пластинку параллельно с ис-

пытуемым раствором, полученным из ч. трехраздельной, наносили испытуемые растворы, полученные из достоверных образцов возможных недопустимых примесей – ч. олиственной (*B. frondosa* L.) и ч. поникшей (*B. cernua* L.). Испытуемые

растворы из образцов ч. олиственной и ч. поникшей были приготовлены аналогично испытуемым растворам из череды трехраздельной.

При просмотре пластинки в УФ-свете при длине волны 254 нм на хроматограмме исследуемого образца ч. поникшей проявляется характерная зона поглощения со значением R_f близким к 0,75, тогда как на хроматограммах образцов ч. трехраздельной и ч. олиственной описанная зона поглощения отсутствует (рисунок 3, см. обложку журнала), т.е. эта зона для ч. поникшей является характерной (диагностической). Как было сказано выше, в методике ГФ 13 [3] приведено описание хроматографического профиля, где на хроматограмме испытуемого раствора также не допускается присутствие темно-коричневого пятна в УФ-свете при длине волны 254 нм с R_f около 0,75 (примесь ч. поникшей).

Полученные хроматограммы обрабатывали способом, который применяли при проведении идентификации сырья и сравнивали хроматографические профили трех исследуемых видов череды (рисунок 4, см. обложку журнала).

В связи с тем, что зона с R_f около 0,75 на хроматограмме образца ч. поникшей характерна при всех видах обнаружения, было решено в методике контроля примесей оставить проявление, описанное в методике идентификации.

Для подтверждения специфичности и робастности методики контроля примесей были проведены дополнительные испытания с другими образцами череды на других хроматографических пластинках (рисунки 5, 6, см. обложку журнала).

Как показывает анализ (рисунки 1, 5, 6), испытуемые растворы, полученные из образцов череды трехраздельной, проявляют близкий хроматографический профиль веществ флавоноидной природы по отношению к выбранным стандартным образцам. В условиях проведения методики контроля недопустимых примесей ч. трехраздельной – ч. олиственную и ч. поникшую, несмотря на то, что хроматографические профили растворов для всех видов череды близки, возможно контролировать по их характерным зонам. Так, при просмотре пластинки после опрыскивания в УФ-свете при длине волны 365 нм, интенсивная желтая флуоресци-

рующая зона, проявляющаяся на хроматограмме испытуемого раствора, полученного из ч. поникшей в нижней части верхней трети хроматограммы (R_f около 0,75) является характерной, и она проявляется даже в случае присутствия данного вида в образцах череды в небольших количествах (менее 5%). При просмотре в дневном свете, эта зона проявляется как интенсивная желтая зона. Характерной является также интенсивная розово-фиолетовая зона на хроматограмме раствора ч. олиственной, которая проявляется почти на том же уровне.

С учетом полученных результатов была выбрана следующая регламентация раздела монографии ГФУ «Другие виды череды»:

Проявление А: просматривают в УФ-свете при 365 нм.

Результаты А: на хроматограмме испытуемого раствора в нижней части верхней трети хроматограммы не должна проявляться интенсивная желтая флуоресцирующая зоны на уровне соответствующей зоны на хроматограмме раствора сравнения ФСО ГФУ череды поникшей (*B. cernua* L.).

Проявление В: просматривают при дневном свете.

Результаты В: на хроматограмме испытуемого раствора в нижней части верхней трети хроматограммы не должны проявляться интенсивная желтая зона на уровне соответствующей зоны на хроматограмме раствора сравнения ФСО ГФУ череды поникшей (*B. cernua* L.) или интенсивная розово-фиолетовая зона на том же уровне (*B. frondosa* L.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены хроматографические условия проведения идентификации сырья череды трехраздельной травы и контроля примесей других видов череды методом ТСХ.

Разработана методика идентификации череды травы методом ТСХ совместно с методикой контроля примесей других видов.

Проведен анализ различных образцов череды травы методом ТСХ в условиях разработанных методик.

Разработанные методики предложены для введения в национальную монографию ГФУ «Череды трава».

SUMMARY

E. E. Kotova, A. G. Kotov,
I. A. Kolychev, S. A. Kotov
DEVELOPMENT OF TLC-METHODS
FOR IDENTIFICATION AND CONTROL
OF IMPURITIES FOR THE NATIONAL
MONOGRAPH OF SPhU
"BUR-MARIGOLD HERB"

Taking into account lack of national regulatory documentation for bur-marigold herb the development of new, modern approaches to the standardization of bur-marigold raw material is relevant taking into account the experience of introducing monographs on the raw material into the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU).

The aim of this work is development of the identification method for biologically active substances of *B. tripartita* L. herb combined with the method of impurities control by the TLC method. In the process of development unified methods of phenolic compounds analysis by the TLC method which are described in the monographs of the SPhU have been used. It has been found out that in conditions of the developed methods the sample solutions obtained from the samples of the *B. tripartita* L exhibit a close chromatographic profile of flavonoid substances nature in relation to the selected standard samples of luteolin and hyperosid that confirms specificity of determination. In the selected conditions inadmissible impurities of the *B. tripartita* L. herb - *B. cernua* L. and *B. frondosa* L. may be controlled by their characteristic zones appearing even when the impurities are present in small quantities (less than 5%).

The developed methods of identifying *B. tripartita* L. herb by the TLC method together with the control method of impurities of other species are proposed to be introduced into the national monograph of the SPhU "Bur-marigold herb".

Keywords: the State Pharmacopoeia of Ukraine, bur-marigold herb, double-tooth, beggars ticks, identification, the TLC method.

ЛИТЕРАТУРА

1. Протопопова, В. В. Род *Bidens* L. в «Определитель высших растений Украины» / В.В. Протопопова – Киев: Наукова думка, 1987. – С. 330–331.
2. Котов, М. І. Рід *Bidens* L. у «Визнач-

ник рослин України» / М. І. Котов – Київ: Урожай. – 1965. – С. 673.

3. Растительные ресурсы СССР: цветковые растения, их химический состав, использование; семейство Астровые – Asteraceae – Л: Наука, 1985. – С. 185–187.

4. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. М.: Медицина, 1989. – 400 с.

5. Государственная фармакопея Республики Беларусь II: в 3 т. Т. 2. – Молодечо: Типография «Победа», 2016. – С. 1339–1340.

6. Государственная фармакопея Российской Федерации: в 3 т. Т. 3. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2015. – 1004 с.

7. Монография ВОЗ о лекарственных растениях, широко используемых в новых независимых государствах (ННГ). – Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2010. – 453 с.

8. Проблеми достовірної діагностики фармакопейного виду причепи: Матеріали VI науково-практичної конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» / Е. Е. Котова [та інш]. – ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», Тернопіль, 10–11 листопада 2016 р. – Тернопіль. – ТДМУ «Укрмедкнига». – 2016. – С. 52–53.

9. До питання макроскопічної ідентифікації лікарської сировини череди трироздільної трави / А. Г. Котов [та інш.] // Фармаком. – 2017. – № 1. – С. 17–22.

10. Котова, Е. Е. Систематизація фармакопейних вимог до методів контролю якості лікарської рослинної сировини. Уніфіковані ТШХ-методи ідентифікації / Е. Е. Котова, А. Г. Котов // Фармаком, 2015. – № 1. – С. 41–47.

Адрес для корреспонденции:

61085, Украина,
г. Харьков, ул. Астрономическая, 33,
ГП "Украинский научный Фармакопейный центр
качества лекарственных средств",
Сектор экспериментальной поддержки
разработки монографий на ЛРС,
e-mail: elkotova61@ukr.net,
Котова Э. Э.

Поступила 22.09.2017 г.

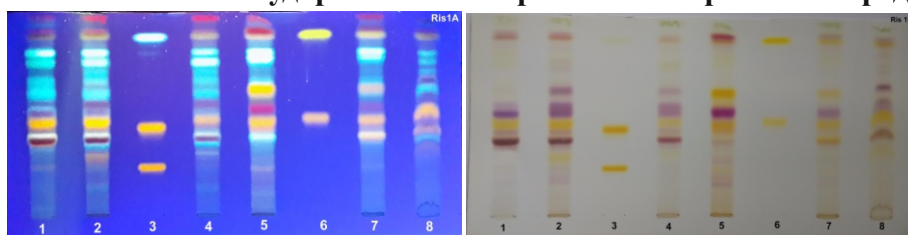
**Рисунки к статье Н. А. Кузьмичева
«Культивирование пажитника сенного в условиях северной части Беларуси» (С. 47-50)**



Рисунок 1 – Пажитник сенной, фазы всходов (а), листовой розетки (б), цветения (в)

Рисунок 2 – Плоды и семена пажитника сенного

**Рисунки к статье Э. Э. Котова, А. Г. Котов, И. А. Колычев, С. А. Котов
«Разработка ТСХ - методик идентификации и контроля примесей для национальной монографии Государственной Фармакопеи Украины «Череды трава»» (С. 62-67)**

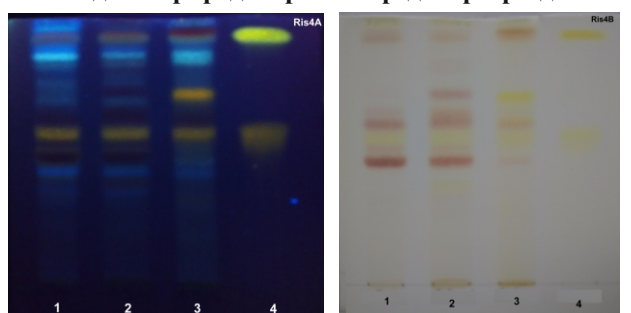


проявление А (УФ 365 нм)

проявление В (дневной свет)

1, 2, 4, 5, 7, 8 – испытуемые растворы, полученные для шести образцов череды травы, 3 – раствор сравнения 1, 6 – раствор СО лютеолина и лютеолин-7-гликозида

Рисунок 1– Вид хроматограмм, полученных при идентификации веществ флавоноидной природы травы череды трехраздельной

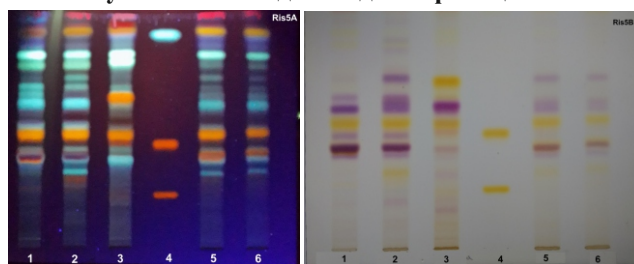


проявление А (УФ 365 нм)

проявление В (дневной свет)

1 – хроматограмма образца ч. трехраздельной, 2 – хроматограмма образца ч. олиственной, 3 – хроматограмма образца ч. поникшей, 4 – хроматограмма СО лютеолина и гиперозида

Рисунок 4 – Вид хроматограмм, полученных при разработке методики контроля примесей других видов череды при проявлении в условиях методики идентификации

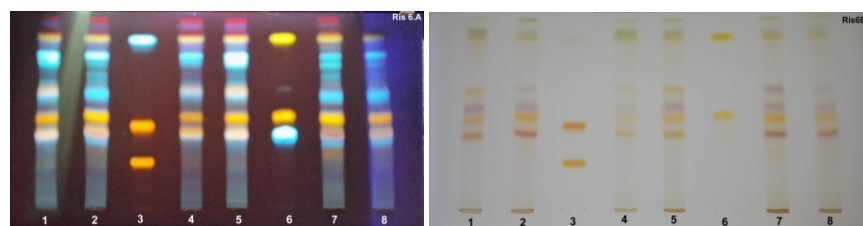


проявление А (УФ 365 нм)

проявление В (дневной свет)

1 – ч. трехраздельная, 2 – ч. олиственная, 3 – ч. поникшая, 4 – раствор сравнения 1, 5 и 6 – различные образцы ч. трехраздельной

Рисунок 5 – Вид хроматограмм, полученных при разработке методики контроля примесей других видов череды на ТСХ -пластинках со стеклянной подложкой

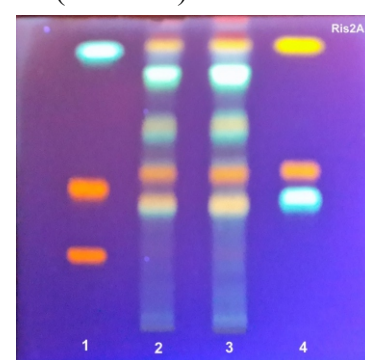


проявление А (УФ 365 нм)

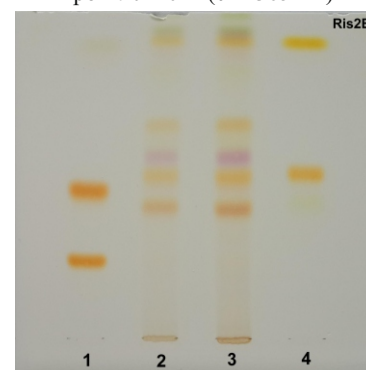
проявление В (дневной свет)

1, 4 – ч. трехраздельная с примесью ч. поникшей; 2, 8 – ч. трехраздельная с примесью ч. олиственной; 3 – раствор сравнения 1; 5 – ч. поникшая; 6 – раствор сравнения 2; 7 – ч. олиственная

Рисунок 6 – Вид хроматограмм, полученных при разработке методики контроля примесей других видов череды на ТСХ-пластинках с алюминиевой подложкой



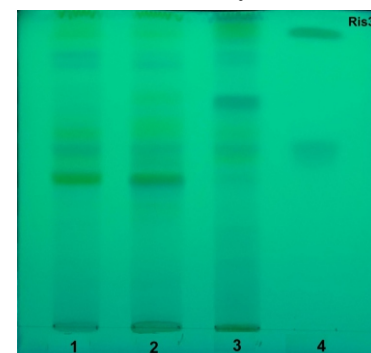
проявление А (УФ 365 нм)



проявление В (дневной свет)

1 – раствор сравнения 1; 2 – 5 мкл испытуемого раствора череды травы, 3 – 10 мкл испытуемого раствора череды травы, 4 – раствор сравнения 2

Рисунок 2 – Вид хроматограмм, полученных при изучении влияния объема нанесения испытуемого раствора на хроматографическую пластинку



Проявление (УФ 254 нм)

1 – ч. трехраздельная, 2 – ч. олиственная, 3 – ч. поникшая, 4 – СО лютеолина и гиперозида

Рисунок 3 – Вид хроматограмм, полученных при разработке методики контроля примесей других видов череды при просмотре в УФ-свете при длине волны 254 нм